

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 261–264

Kinetische Bestimmung des Harnstoffes mit dem LKB-System

Von H.-G. Eisenwiener

Laboratorien der Abteilung Diagnostica der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

(Eingegangen am 10. Oktober/14. November 1975)

Zusammenfassung: Es wurde die kinetische Bestimmung des Harnstoffes basierend auf der Urease/Glutamatdehydrogenase-Methode für das LKB Reaction Rate Analyzer System 8600 adaptiert. Bei einem Verhältnis von 1:50 zwischen Proben- und Reagenzvolumen wird ein gesicherter Linearitätsbereich bis 33,3 mmol/l bei einer Präzision von Tag zu Tag von etwa 5% erhalten. Paralleluntersuchungen wurden sowohl manuell mit der *Berthelot*/Salicylatmethode als auch auf dem Centrifichem System mit der Urease/Glutamatdehydrogenase-Methode durchgeführt.

Kinetic determination of urea with the LKB System

Summary: The kinetic determination of urea based on the urea/glutamate dehydrogenase method was adapted for the LKB Reaction Rate Analyzer System 8600. A ratio of sample to reagent volume of 1:50 ensures linearity up to 33.3 mmol/l with a day to day precision of 5%. Parallel studies with the urease/glutamate dehydrogenase method were performed with the Centrifichem System and with the manual *Berthelot*/Salicylate method.

Einführung

Bislang wird die Bestimmung des Harnstoffes meistens mit der Urease/*Berthelot*-Methode bzw. mit der Diacetylmonoxim-Methode ausgeführt. Die Durchführung ist relativ zeitaufwendig und erfordert im allgemeinen 2 Inkubationszeiten bzw. eine Enteiweißung. Nach Spaltung des Harnstoffes mittels Urease bildet der freigesetzte Ammoniak bei der *Berthelot*-Reaktion über das Chloramin mit Salicylsäure bzw. Phenol ein grünblau gefärbtes Indolderivat; bei der Diacetylmonoxim-Methode bildet der Harnstoff mit Diacetylmonoxim in saurer Lösung einen roten Farbstoff, der photometrisch bestimmt wird. *Talke & Schubert* (1) veröffentlichten 1964 die vollenzymatische Bestimmung des Harnstoffes mit Urease und Glutamatdehydrogenase.

Die auch seitens *Gutmann & Bergmeyer* (2) ausführlich beschriebene Methode ist eine Endpunktmethode mit großer Reaktionszeit, nicht ausreichender Linearität bzw. sehr ungünstigem Verhältnis von Probe zu Reagenzvolumen. Diese beiden letzten Punkte lasten auch der bisher veröffentlichten Methode von *Haeckel* (3), der das Urease/Glutamatdehydrogenase System auf das Gensac System adaptierte, an. Die Linearität reicht nur bis etwa 23 mmol/l (140 mg/100 ml) bei dem recht ungünstigen Verhältnis von 1:150 zwischen Probe zu Reagenzvolumen. Durch Erhöhung der NADH-Konzen-

tration kann wohl eine geringe, aber keine bedeutend bessere Linearität erreicht werden.

Es wurde festgestellt, daß durch Änderung des bislang meist verwendeten Puffersystems und des pH sowie durch eine Abstimmung der beiden Enzymaktivitäten von Urease und Glutamatdehydrogenase eine Erweiterung des Linearitätsbereiches bis mindestens 34 mmol/l (≈ 200 mg/100 ml) möglich ist. Bei dem hier aufgezeigten Reagenzsystem kann mit einem Verhältnis von nur 1:30 zwischen Probe- und Reagenzvolumen gearbeitet werden. Dieses Reagenz bewährte sich sehr gut für die Harnstoff-Bestimmung mit dem Centrifichem System, wobei 15 μ l Probenvolumen und nur 350 μ l Reagenz bei einer Reaktionszeit von nur 1 min eingesetzt wird (4). Aus der Extinktionsdifferenz zwischen der 30. und 90. Sekunde nach dem Mischen wird auf die Harnstoff-Konzentration mit Hilfe eines Standards geschlossen. Es wurde nun versucht, das gleiche Reaktionssystem auf den LKB Reaction Rate Analyzer 8600 zu adaptieren. Bei dem aufgezeigten Verfahren wird mit Glutamatdehydrogenase gestartet, wobei das freie Ammoniak in der Probe miterfaßt wird. Von der Theorie her wäre es günstiger, die Reaktion mit Urease zu starten. Untersuchungen, mit Urease die Reaktion zu beginnen, sind in Vorbereitung, jedoch scheint es günstiger zu sein, nach Beendigung der hydroly-

tischen Spaltung des Harnstoffes das freigesetzte Ammoniak mit der Glutamatdehydrogenase als initial rate Methode zu bestimmen. Aus den aufgezeigten Versuchsergebnissen kann ersehen werden, daß die Bestimmung des Harnstoffes sehr elegant kinetisch mit einem Rate Analyzer durchgeführt werden kann.

Material und Methoden

Geräte

LKB Reaction Rate Analyzer 8600
CentrifChem System

Vergleichsreagenzien

Für die Paralleluntersuchungen wurden Testpackungen von Diagnostica (F. Hoffmann-La Roche, Basel) eingesetzt: „Harnstoff“ (Methode: Urease/Berthelot mit Salicylatreagenz) und „Harnstoff“ für das CentrifChem System (Methode Urease/Glutamatdehydrogenase). Bei den durchgeführten manuellen und CentrifChem-Vergleichsuntersuchungen wurden jeweils Proben-Leerwerte mitgeführt.

Apparat-Einstellungen für LKB-System 8600

Wellenlänge: 340 nm, Meßzeit: 1 min, Meßbereich: 0.050, Reaktionsverlauf: Decrease, Hintergrund: 0.1, Einspritzvolumen: 50 µl.

Testkonzentrationen

NaH₂PO₄ 24 mmol/l, Na₂HPO₄ 13 mmol/l, pH = 6,7, 2-Oxoglutarat 250 mmol/l, Urease (EC 3.5.1.5) > 900 U/l, Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3) > 1500 U/l, NADH > 80 µmol/l. Die Glutamatdehydrogenase-Lösung der Testpackung wurde mit physiol. NaCl 1 + 19 verdünnt.

Pipettierung

Zu 1 ml Reagenz werden 20 µl Probe pipettiert und nach 15 min bei 35°C mit 50 µl verdünnter Glutamatdehydrogenase-Lösung gestartet.

Berechnung

Die Berechnung wurde mit einem Standard von 6,67 mmol Harnstoff/l (\approx 40 mg/100 ml) durchgeführt. Eine Berücksichtigung des Reagenzien-Leerwertes erübrigte sich, da er nur innerhalb unserer Auswertegenauigkeit schwankte. Die Änderung des Reagenzien-Leerwertes im Auswertintervall von 30 s variierte zwischen 0,0006–0,0008 Extinktionseinheiten. Dieser Unterschied entspricht 0,12–0,16 mmol/l Harnstoff. Die faktorielle Berechnung ist ebenfalls möglich, wobei der Faktor allerdings empirisch zuvor mit Hilfe einer wäßrigen Verdünnungsreihe zu ermitteln ist, denn es handelt sich um keine Endpunktreaktion, sondern um eine initial rate Methode. Dabei ist es nicht notwendig, den Harnstoff in eine wäßrige Albumin-Lösung einzuwiegen. Es wird jedoch empfohlen, stets die Berechnung mit Hilfe eines Standards durchzuführen, um eventuell auftretende systematische Änderungen zu berücksichtigen.

Ergebnisse

Linearitätsbereich

Der Linearitätsbereich wurde mit einer wäßrigen Verdünnungsreihe von Harnstoff bis 33,3 mmol/l (200 mg/100 ml) überprüft. Bei jedem Rack wurde 1 Reagenzien-Leerwert mitgeführt, der jedoch nicht berücksichtigt wurde. Aus Abbildung 1 geht ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Extinktionsdifferenz pro 30 s und der Konzentration bis < 33 mmol/l

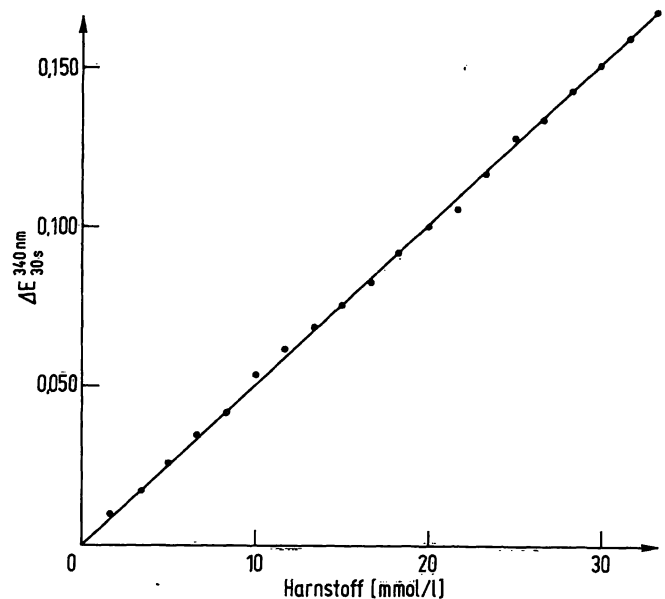


Abb. 1. Linearitätsbereich

(\approx 200 mg/100 ml) Harnstoff hervor. Die Bestimmung wurde mit dem Meßbereich (Range) 0.05 bzw. 0.2 durchgeführt. Aus Abbildung 1 kann eine Änderung von 0,083 Extinktionseinheiten pro 30 s und 16,7 mmol Harnstoff (\approx 100 mg/100 ml) bei einem Verhältnis von 1:50 zwischen Probe- und Reagenzvolumen ersehen werden. Daraus folgt bei einer großzügig angenommenen Auswertungsungenauigkeit von 1 Skalenteil (entspricht 0,0005 Einheiten) ein maximaler Fehler von 0,1 mmol/l (0,6 mg/100 ml).

Richtigkeit

Die Richtigkeit der kinetischen Harnstoff-Bestimmung wurde mit diversen Kontrollseren überprüft. Aus Tabelle 1 geht eine Gegenüberstellung der gefundenen und der deklarierten Werte hervor. Da die meisten Kontrollseren jeweils in den Einheiten mg/100 ml deklariert sind, wurden die gefundenen Resultate ebenfalls in mg/100 ml angegeben bzw. in mg/100 ml Harnstoff aus mg/100 ml Harnstoff-N umgerechnet. Leider geht im allgemeinen bei den Deklarationen nicht hervor, ob ein Proben-Leerwert bei der Bestimmung mitgeführt wurde.

Präzision

Die Präzision wurde sowohl mit wäßrigen Lösungen an Harnstoff als auch mit Kontrollseren in der Serie (N=10) und von Tag zu Tag (N=20) überprüft. Bei den Untersuchungen von Tag zu Tag wurden die lyophilisierten Kontrollseren täglich frisch aufgelöst. Aus Tabelle 2 gehen die erhaltenen Resultate bezüglich Präzision in der Serie und von Tag zu Tag hervor.

Tab. 1. Richtigkeit, Überprüfung mit Kontrollsera

Kontrollserum	Deklarationsmethode	deklarierte Werte [mg/100 ml]	gefundener Wert [mg/100 ml]
<i>Hyland I</i> 0369 GOO 4A1	SMA 12/30		
	SMA 12/60, 6/60	32,1	
	Hyland: Phenate-hypochlorite		
	Beckman Rate conductometric	29,9–32,1–34,2	32,2
	Diacetylmonoxim		
<i>Hyland II</i> 0368 T 006 A1	BUN, strate	29,9–34,2–38,5	
	Urograph	29,9–38,5–47,1	
	SMA 12/30		
	SMA 12/60, 6/60	105	
	Hyland: Phenate-hypochlorite		
<i>Moni-Trol II</i> Lot 39 A, B	Beckman Rate conductometric	101–105–109	100,6
	Diacetylmonoxim		
	BUN, strate	90–101–111	
	Urograph	88–113–139	
	Hycel Mark X	116	
<i>Moni-Trol I</i> Lot 131 A, B	Roche: <i>Berthelot</i> -Reaktion mod. mit Salicylatreagenz	75 –83 –91	
	SMA 12/60	82,7–83,5–84,3	
	Auto-Analyzer: N-1c 1/11	80,8–86 –91,3	
	Merck: DAM Diacetylmonoxim-Reaktion nach Enteiweißung	77 –86 –95	85,8
	Merck: <i>Berthelot</i> ; Urease-Spaltung, Ammoniumbestimmung	77 –86 –95	
<i>Pathotrol</i> 66 A-Z	Boehringer	78 –87 –96	
	Roche: <i>Berthelot</i> -Reaktion mod. mit Salicylatreagenz	30 –33 –36	
	SMA 12/60	33,5–34,5–35,5	
	Auto-Analyzer: N-1c 1/11	33,6–36,2–38,7	35,2
	Merck: DAM Diacetylmonoxim-Reaktion nach Enteiweißung	29 –34 –39	
<i>Labtrol</i> 42 A-Z	Merck: <i>Berthelot</i> ; Urease-Spaltung, Ammoniumbestimmung	28 –33 –38	
	Boehringer	30 –35 –40	
	DAM Diacetylmonoxim-Reakt. nach Enteiweißung	60,5–68,5–76,5	75,4
	<i>Berthelot</i> -Urease-Spaltung;	67,0–75,0–83,0	
	<i>Berthelot</i> -Reaktion	59,5–67,5–75,5	
<i>Seronorm</i> 118	<i>Berthelot</i> -Reaktion mod. mit Salicylatreagenz	42 –46 –50	
	DAM Diacetylmonoxim-Reaktion nach Enteiweißung	28,1–32,1–36,1	46,4
	<i>Berthelot</i> Urease-Spaltung; Ammoniumbestimmung nach <i>Berthelot</i>	41,0–46,0–51,0	
		40,0–45,0–50,0	
	Auto-Analyzer. Diacetylmonoxim-Reaktion	53	
	Photometrisch nach <i>Berthelot</i>	48,5	
	Urease/Nessler's Reagenz	51	50,3

Tab. 2. Präzision in der Serie (N=10) und von Tag zu Tag (N=20)

Präzision in der Serie

mit wässrigen Lösungen

$\bar{x} = 33,3$ mmol/l (200 mg/100 ml)	$s = \pm 0,50$ mmol/l	VK = 1,5%
$\bar{x} = 16,7$ mmol/l (100 mg/100 ml)	$s = \pm 0,27$ mmol/l	VK = 1,6%
$\bar{x} = 1,67$ mmol/l (10 mg/100 ml)	$s = \pm 0,058$ mmol/l	VK = 3,4%

mit Kontrollseren

Monitrol I	5,46 mmol/l	$s = \pm 0,16$ mmol/l	VK = 2,93%
Hyland II	16,96 mmol/l	$s = \pm 0,40$ mmol/l	VK = 2,4%

Präzision von Tag zu Tag

Monitrol I 131 AB			
$\bar{x} = 5,50$ mmol/l	$s = \pm 0,352$ mmol/l	VK = 6,4%	
Hyland II 0368G 004 A1			
$\bar{x} = 16,82$ mmol/l	$s = \pm 0,718$ mmol/l	VK = 4,3%	

Vergleichsuntersuchungen

Die kinetische Harnstoff-Bestimmung wurde sowohl manuell nach der *Berthelot*/Salicylat-Methode als auch mit dem LKB und dem Centrifichem System mit 40 bzw. 60 Seren parallel untersucht und überprüft. Bei der manuellen Methode wurde prinzipiell ein Proben-Leerwert mitgeführt, der sowohl die Eigenabsorption

Tab. 3. Vergleichsuntersuchungen. In 40 Seren wurde parallel, sowohl manuell als auch mit dem LKB und Centrifichem System, der Harnstoff bestimmt.

manuelle Methode: Urease/*Berthelot*-Reaktion mit Salicylat
LKB + Centrifichem: kinetische Methode mit Urease/
Glutamatdehydrogenase

$$y_{\text{Centrifichem}} = 0,4092 + 0,9115 x_{\text{manuell}}$$

$$\bar{x} = 5,79 \text{ mmol/l}$$

$$\bar{y} = 5,69 \text{ mmol/l}$$

$$r = 0,982$$

$$n = 40$$

$$y_{\text{LKB}} = 0,4388 + 0,9788 x_{\text{Centrifichem}}$$

$$\bar{x} = 5,68 \text{ mmol/l}$$

$$\bar{y} = 6,01 \text{ mmol/l}$$

$$r = 0,980$$

$$n = 40$$

$$y_{\text{LKB}} = 0,7386 + 0,911 x_{\text{manuell}}$$

$$\bar{x} = 5,79 \text{ mmol/l}$$

$$\bar{y} = 6,01 \text{ mmol/l}$$

$$r = 0,981$$

$$n = 40$$

$$y_{\text{LKB}} = 0,393 + 0,985 x_{\text{manuell}}$$

$$\bar{x} = 10,04 \text{ mmol/l}$$

$$\bar{y} = 10,29 \text{ mmol/l}$$

$$r = 0,997$$

$$n = 60$$

der Probe als auch die hinzukommende Trübung der Urease-Suspension berücksichtigt. Durch den automatischen Abgleich der Extinktion auf 0 nach Zugabe der Glutamatdehydrogenase und durch Einsatz einer Urease-Lösung wird bei dem kinetischen Verfahren eine korrekte Berücksichtigung des Proben-Leerwertes erreicht. Aus der Tabelle 3 gehen die erhaltenen Regressionsgeraden, Korrelationskoeffizienten und Mittelwerte hervor. In Abbildung 2 sind die gefundenen Werte auf dem LKB System gegen die manuell ermittelten Werte aufgetragen.

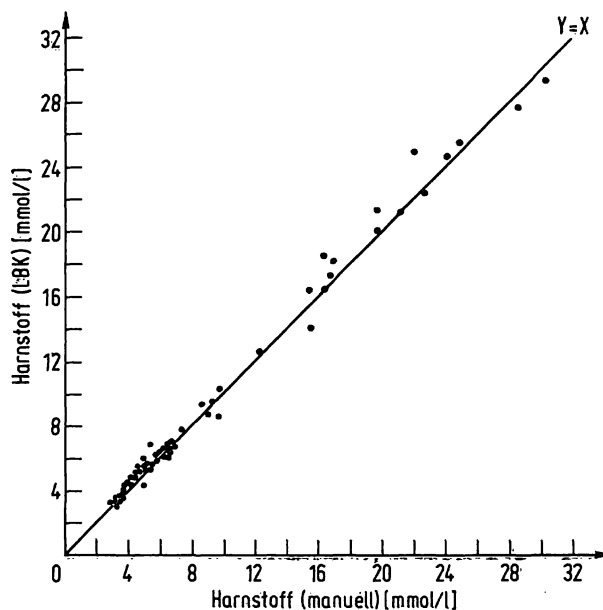


Abb. 2. Vergleichsuntersuchungen

Literatur

1. Talke, H. & Schubert, G. E. (1965), *Klin. Wochenschr.* **43**, 174–175.
2. Gutmann, I. & Bergmeyer, H. U. (1974), in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., Ed.), Bd. II, 3. Aufl., pp. 1839–1849, Verlag Chemie, Weinheim.

3. Haeckel, R. & Mathias, D. (1974), *diese Z.* **12**, 515–520.
4. Eisenwiener, H. G. (1975), *diese Z.* **13**, 244–200.

Dr. H.-G. Eisenwiener
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG
Abt. Diagnostica
CH-4133 Schweizerhalle/Basel